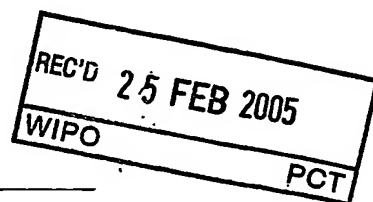




PCT/FR 2004/050661



# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 07 JAN. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

**PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)**

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

**BEST AVAILABLE COPY**



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 5

REMISE DES PIÈCES

DATE 69 INPI LYON

LIEU

0314364

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

09 DEC. 2003

Vos références pour ce dossier  
(facultatif) Ref : BREASTAM

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDAT.  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

bioMérieux  
Département de la Propriété Industrielle

Chemin de l'Orme  
69280 MARCY L'ETOILE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen Demande de brevet initiale

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Sui

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale

☐ Personne physique

Nom

ou dénomination sociale

bioMérieux

Prénoms

Forme juridique

S.A.

N° SIREN

16 73 62 03 99

Code APE-NAF

Domicile

ou

siège

Rue

Chemin de l'Orme

Code postal et ville

16 92 80 MARCY L'ETOILE

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

04.78.87.53.28

N° de télécopie (facultatif) 04.78.87.21.16

Adresse électronique (facultatif)

catherine.duret@eu.biomerieux.com



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

BR2

9 DEC 2003  
REMISE DES PIÈCES  
DATE 69 INPI LYON  
LIEU 0314364  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE</b> (si applicable)		Nom		DENJEAN
		Prénom		Frédérique
		Cabinet ou Société		bioMérieux
		N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		PG 10870
Adresse	Rue	Chemin de l'Orme		
	Code postal et ville	16 012 18 101 MARCY L'ETOILE		
	Pays	FRANCE		
		N° de téléphone (facultatif)		04.78.87.75.70
		N° de télécopie (facultatif)		04.78.87.21.16
		Adresse électronique (facultatif)		frédérique.denjean@eu.biomerieux.com
<b>7 INVENTEUR(S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé		
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]		
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes				
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Frédérique DENJEAN Ingénieur Brevets		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 		

La présente invention concerne un procédé pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein. L'invention concerne également des amorces d'amplification et des sondes d'hybridation qui peuvent être mises en oeuvre dans ce procédé, ainsi qu'un kit de diagnostic/pronostic du cancer du sein.

5

Le cancer du sein est une maladie fréquente : une femme sur onze développe un cancer du sein au cours de sa vie. Cependant, parce qu'il existe différents types de cancers du sein, et différents pronostic du cancer du sein, les femmes qui en sont atteintes ne suivent pas toutes le même traitement : le médecin propose à chaque patiente un traitement adapté à sa situation, afin d'obtenir les meilleures chances de guérison.

10

Ainsi, l'hormonothérapie, qui est un traitement général dans les cancers du sein, est utilisé dans les cancers du sein hormono-dépendants, c'est à dire dans le cas de tumeurs exprimant des récepteurs hormonaux à la surface de leurs cellules. En post-opératoire, l'hormonothérapie peut être utilisée seule ou en relais de la chimiothérapie adjuvante.

15

Dans le cadre d'une récurrence de la maladie, l'hormonothérapie peut être prescrite soit seule, soit associée ou en relais d'une chimiothérapie.

La chimiothérapie, est quant à elle, un traitement général du cancer puisque les médicaments, portés par la circulation sanguine, peuvent agir partout dans l'organisme.

20

La chimiothérapie a une place importante dans l'arsenal thérapeutique, particulièrement depuis une dizaine d'années, avec l'apparition de nouvelles molécules. Les médicaments sont le plus souvent administrés en perfusion par voie veineuse, en voie sous-cutanée, en intra-musculaire.

Ainsi, en fonction de l'expression des récepteurs hormonaux à la surface des cellules hormonales, le traitement sera orienté vers une hormonothérapie ou non.

25

On peut citer notamment les récepteurs à l'œstrogène ESR1 et ESR2 et le récepteur à la progestérone (PGR), qui sont les paramètres les plus connus pour prédire la réponse à une hormonothérapie dans le cancer du sein. Ainsi la teneur en ESR1 est utilisé comme indicateur pronostic, et pour prédire la réponse d'un patient à un traitement avec des antioestrogènes, tels que le Tamoxifen® (Osborne C et al, Brest Cancer Res treat 51 :227-238, 1998 ; Goldhirsch et al, J Clin Oncol 19 :3817-3827, 2001). La présence du récepteur PGR est également utilisée pour le suivi d'une hormonothérapie, et comme marqueur de pronostic (Horwitz et al, Recent Prog Horm Res 41 : 249-316, 1995). On

30

peut également citer le récepteur HER2, qui serait surexprimé dans environ ¼ des cancers du sein invasif (Slamon et al, Science, 1987, 235 :177-182)

Afin de proposer aux patients un traitement adapté, il est donc essentiel de connaître

l'expression de gènes codant des récepteurs hormonaux, tels que ESR1, ESR2, HER2 et

5 PGR. Cette expression est étudiée le plus souvent sur la tumeur primitive et le plus

souvent par immunohistochimie. Dans les cas douteux, l'étude d'une amplification

génique par hybridation in situ (FISH) est la méthode de référence, notamment dans le

cas de HER2. Depuis quelques années, des tumeurs de petites tailles peuvent être

détectées, permettant un diagnostic précoce d'un cancer du sein, mais le pronostic de ce

10 cancer reste alors difficile de part la faible quantité de tissu tumoral qui rend difficile la

quantification protéique des récepteurs hormonaux mentionnés précédemment. Les

techniques de biologie moléculaire deviennent alors indispensable pour la quantification

de récepteurs hormonaux, puisqu'elles nécessitent de plus petites quantités de tissu

tumoral (Fuqua et al, Natl Cancer Inst 82 :859-861, 1997 ; Fasco et al, Anal Biochem,

15 245 : 167-178, 1997 ; Poola et al, Anal Biochem, 258 : 209-215, 1998).

La présente invention propose un nouveau procédé pour le diagnostic/pronostic du

cancer du sein. Ce procédé met notamment en oeuvre de nouvelles séquences

nucléotidiques qui peuvent être utilisées en tant qu'amorces d'amplification ou de

sondes d'hybridation. Le procédé selon l'invention permet notamment de déterminer

20 quel est le traitement le plus adapté à un patient atteint d'un cancer du sein.

A ce titre, l'invention concerne un procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du

sein comprenant les étapes suivantes :

A - on extrait le matériel nucléaire d'un échantillon biologique,

B - on utilise au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des

25 amplicons d'au moins une séquence cible du matériel nucléaire

C - on utilise au moins une sonde de détection pour détecter la présence desdits

amplicons

caractérisé en ce que, lors de l'étape B, ladite paire d'amorce comprend au moins une

amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence

30 nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°24 et/ou lors de l'étape C), ladite

~~sonde de détection comprend au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence~~

~~nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20.~~

D'une manière surprenante, les inventeurs ont ainsi découvert que l'utilisation, dans un procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein, d'une séquence nucléotidique comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi les SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 est très pertinent en tant qu'amorce  
 5 d'amplification pour amplifier des séquences cibles, tels que le gène codant ESR1, ESR2, PGR ou HER2. Les inventeurs ont également découvert que l'utilisation d'une séquence nucléotidique comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi les SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 en tant que sonde  
 10 d'hybridation est très pertinente pour une hybridation spécifique sur des séquences cibles, tels que les gènes codant ESR1, ESR2, PGR ou HER2.

Au sens de la présente invention, on entend par échantillon biologique, tout échantillon susceptible de contenir un matériel nucléique tel que défini ci après. Cet échantillon biologique peut être prélevé chez un patient et peut être notamment un échantillon de  
 15 tissus, de sang, de sérum, de salive, de cellules circulantes du patient. Préférentiellement, cet échantillon biologique est prélevé d'une tumeur. On dispose de cet échantillon biologique par tout type de prélèvement connu de l'homme du métier.

Au sens de la présente invention, le matériel nucléique comprend une séquence d'acides nucléiques telle que séquence d'acides désoxyribonucléiques (ADN) ou d'acides  
 20 ribonucléiques (ARN). Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le matériel nucléique comprend une séquence d'acides désoxyribonucléiques. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le matériel nucléique est extrait d'un échantillon biologique prélevé chez un patient.

Par séquence nucléotidique (ou séquences d'acides nucléiques ou fragment  
 25 nucléotidique ou oligonucléotide, ou polynucléotide), on entend un enchaînement de motifs nucléotidiques assemblés entre eux par des liaisons ester phosphorique, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à une autre séquence d'acides nucléiques, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide  
 30 nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique.

Par motif nucléotidique, on entend un dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement

phosphate et une base azotée; dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose, dans l'ARN le sucre est le ribose ; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre

5 d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5désoxyuridine ou toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le

10 remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991), soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les diphosphates, alkyl- et aryl-phosphonates et phosphorothioates. Ce matériel nucléique comprend au moins une séquence cible. Par séquence cible, on entend une séquence dont

15 l'enchaînement en motifs nucléotidiques est spécifique d'un gène cible, tel que préférentiellement le gène codant ESR1, ESR2, PGR ou HER2. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la séquence cible est comprise dans un gène choisi parmi les gènes codant ESR1, ESR2, PGR ou HER2. Dans la suite de l'exposé, on parlera de séquence cible qu'elle soit en simple brin ou en double brin.

20 Lors de l'étape A, on extrait le matériel nucléique d'un échantillon biologique par tout protocole connu de l'homme du métier. A titre indicatif, l'extraction d'acides nucléique peut être réalisée par une étape de lyse des cellules présentes dans l'échantillon biologique, afin de libérer les acides nucléiques contenus dans les enveloppes

25 protéiques et/ou lipidiques des cellules (comme des débris cellulaires qui perturbent les réactions ultérieures). A titre d'exemple, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet WO00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique, WO99/53304 sur la lyse électrique, et WO99/15321 sur la lyse mécanique. L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues, telles que les

30 chocs thermiques ou osmotiques ou les lyses chimiques par des agents chaotropiques tels que les sels de guanidium (US 5,234,809). Cette étape de lyse peut également être

~~suivie d'une étape de purification, permettant la séparation entre les acides nucléiques et~~

~~les autres constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse. Cette étape permet~~

généralement de concentrer les acides nucléiques, et peut être adapté à la purification d'ADN ou d'ARN. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques éventuellement revêtues d'oligonucléotides, par adsorption ou covalence (voir à ce sujet les brevets US 4,672,040 et US 5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet WO97/45202 et WO99/35500. Un autre exemple intéressant de méthode de purification des acides nucléiques est l'utilisation de silice soit sous forme de colonne, soit sous forme de particules inertes (Boom R. et al., J. Clin. Microbiol., 1990, n°28(3), p. 495-503) ou magnétiques (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSil™ Paramagnetic particles). D'autres méthodes très répandues reposent sur des résines échangeuses d'ions en colonne ou en format particulaire paramagnétique (Whatman: DEAE-Magarose) (Levison PR et al., J. Chromatography, 1998, p. 337-344). Une autre méthode très pertinente mais non exclusive pour l'invention est celle de l'adsorption sur support d'oxyde métallique (société Xtrana: matrice Xtra-Bind™).

Lorsque l'on souhaite extraire spécifiquement l'ADN d'un échantillon biologique, on peut notamment réaliser une extraction par du phénol, du chloroforme et de l'alcool pour éliminer les protéines et précipiter l'ADN avec de l'alcool 100%. L'ADN peut alors être culoté par centrifugation, lavé et remis en suspension.

Lors de l'étape B, on utilise au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons d'au moins une séquence cible du matériel nucléaire.

Au sens de la présente invention, on entend par amorce d'amplification, une séquence nucléique comprenant de 10 à 100 motifs nucléotidiques, préférentiellement de 15 à 25 motifs nucléotidiques. Cette amorce d'amplification comprend au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence choisie parmi les SEQ ID N°1 à 20. Au sens de la présente invention, une amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de

- une séquence homologue à la SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20, c'est à dire



- la séquence complémentaire ou suffisamment complémentaire de la SEQ ID N°1 à 20

- une séquence présentant une homologie suffisante pour s'hybrider à la SEQ ID N°1 à SEQ ID °20 ou à la séquence complémentaire à la SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20,

- une séquence comprenant une séquence de SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 (ou une séquence homologue à SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 telle que définie précédemment) dans laquelle les bases uracile sont substituées aux bases thymine,

10 et qui aurait la même fonction que l'amorce d'amplification selon l'invention, c'est à dire amplifier tout ou partie du gène codant ESR1, ESR2, PGR ou HER2, est considérée comme équivalente à l'amorce d'amplification selon l'invention.

Une paire d'amorces d'amplification permet l'initiation d'une polymérisation enzymatique, telle que notamment une réaction d'amplification enzymatique.

15 Par réaction d'amplification enzymatique, on entend un processus générant de multiples copies (ou amplicons) d'une séquence nucléique par l'action d'au moins une enzyme. Au sens de la présente invention, on entend par amplicons les copies de la séquence cible obtenues lors d'une réaction d'amplification enzymatique. De telles réactions d'amplification sont bien connues de l'homme du métier et on peut citer notamment la

20 PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159 ; la LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0 201 184 ; la RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069 ; la 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995 ; la NASBA (Nucleic Acid

25 Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, ou encore la TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

D'une manière générale, ces réactions d'amplification enzymatique mettent généralement une succession de cycle comprenant les étapes suivantes :

- la dénaturation de la séquence cible si celle ci est en double brin afin d'obtenir deux brins cibles, complémentaires,

---

○ l'hybridation de chacun des brins cibles, obtenus lors de l'étape de dénaturation précédente avec au moins une amorce d'amplification ,

---

- la formation à partir des amorces d'amplification des brins complémentaires aux brins sur lesquels elles sont hybridées en présence d'une enzyme polymérase et de nucléosides triphosphate (ribonucléoside triphosphate et/ou desoxyribonucléoside triphosphate selon les techniques)

5 ce cycle étant répété un nombre de fois déterminé pour obtenir la séquence cible dans une proportion suffisante pour permettre sa détection.

Par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux séquences nucléiques telle que notamment une amorce d'amplification et une séquence cible ou une sonde d'hybridation et une séquence cible, 10 se lient avec des liaisons hydrogènes stables et spécifiques pour former un double brin. Ces liaisons hydrogènes se forment entre les bases complémentaires Adénine (A) et thymine (T) (ou uracile (U)) (on parle de liaison A-T) ou entre les bases complémentaires Guanine (G) et cytosine (C) (on parle de liaison G-C). L'hybridation de deux séquences nucléiques peut être totale (on parle alors de séquences 15 complémentaires), c'est à dire que le double brin obtenu lors de cette hybridation comprend uniquement des liaisons A-T et des liaisons C-G. Cette hybridation peut être partielle (on parle alors de séquences suffisamment complémentaires), c'est à dire que le double brin obtenu comprend des liaisons A-T et des liaisons C-G permettant de former le double brin, mais également des bases non liées à une base complémentaire. 20 L'hybridation entre deux séquences complémentaires ou suffisamment complémentaires dépend des conditions opératoires qui sont utilisées, et notamment de la stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases des deux séquences nucléiques, ainsi que par le degré de mésappariement entre ces deux séquences nucléiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la 25 réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier.

D'une façon plus précise, la NASBA est une technologie d'amplification isotherme de 30 l'acide nucléique reposant sur l'action conjointe de trois enzymes (transcriptase inverse AMV, Rnase-H et polymérase-ARN T7). Associée à des amorces d'amplification spécifiques d'une séquence cible, elle amplifie les cibles ARN plus d'un milliard de fois

en 90 minutes. La réaction d'amplification se produit à 41°C et donne des molécules d'ARN simple brin comme produit final. La NASBA nécessite une paire d'amorce, dont au moins une comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Une telle amorce est préférentiellement choisie  
5 parmi les SEQ ID N°21 à 24. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.

10 Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorces, utilisée de l'étape B, est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce  
15 d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°1, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°2, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant ESR1, d'une taille de 202 paires de base,  
20 qui correspond à la séquence 1427-1629 sur la séquence du gène codant ESR1 de référence (Genbank X03635).

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce  
25 d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°3, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°4, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant PGR, d'une taille de 184 paires de base,  
30 qui correspond à la séquence 2761-2945 sur la séquence codant PGR de référence (Genbank NM\_000926).

---

- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°5, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°6, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène ESR2, d'une taille de 210 paires de base, qui correspond à la séquence 1640-1850 sur la séquence codant ESR2 de référence (Genbank MN\_001437)
- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°7, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°8, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant HER2, d'une taille de 185 paires de base, qui correspond à la séquence 2567-2752 sur la séquence codant HER2 de référence (Genbank NM\_00448).
- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°13 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°14 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°13, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°14, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant ESR1, d'une taille de 858 paires de base, qui correspond à la séquence 808-1666 sur la séquence codant ESR1 de référence (Genbank X03635).
- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques

de la séquence nucléotidique SEQ ID N°15 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°16 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°15, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°16, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant PGR, d'une taille de 658 paires de base, qui correspond à la séquence 2319-2977 sur la séquence codant PGR de référence (Genbank NM\_000926).

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°17 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°18 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°17, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°18, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant ESR2, d'une taille de 702 paires de base, qui correspond à la séquence 1246-1948 sur la séquence codant ESR2 de référence (Genbank MN\_001437).

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°19 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°20 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°19, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°20, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant HER2, d'une taille de 928 paires de base, qui correspond à la séquence 2123-3051 sur la séquence codant HER2 de référence (Genbank NM\_004448).

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorces, utilisée

de l'étape B, comprend une première amorce comprenant un promoteur permettant

~~l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7, est choisie~~

---

parmi les paires d'amorce suivantes :

- une première amorce d'amplification de SEQ ID N°21 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2;
- 5 □ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°22 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ;
- 10 □ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°23 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ;
- 15 □ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°24 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ;

Afin de tenir compte de la variabilité d'efficacité enzymatique qui peut être observée lors des différentes étapes de la réaction d'amplification, on peut normaliser l'expression d'un gène cible par la détermination simultanée de l'expression d'un gène dit de ménage, dont l'expression est similaire chez les différents groupes de patients. En réalisant un rapport entre l'expression du gène cible et l'expression du gène de ménage, on corrige ainsi toute variabilité entre les différentes expérimentations. L'homme du métier pourra se référer notamment aux publications suivantes : Bustin SA *Journal of molecular endocrinology*, 2002, 29 : 23-39 ; Giulietti A *Methods*, 2001, 25 : 386-401. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, on utilise, en outre, lors de l'étape B, au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage. Par gène de ménage, on entend un gène dont l'expression est stable dans un tissu donné, et quelque soit la situation physiologique. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le gène de ménage est le gène PPIB qui code la cyclophylène B. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ladite amorce d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage comprend

au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence choisie parmi les SEQ ID N°25 à 29.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage est choisie

5 parmi les paires d'amorce suivantes :

10 ☐ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°27 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°28; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°27, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°28, on obtient un amplicon, spécifique du gène PPIB, d'une taille de 239 paires de base, qui correspond à la séquence 231-470 sur la séquence PPIB de référence (Genbank M60857)

15 ☐ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°25 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°26; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°25, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°26, on obtient un amplicon, spécifique du gène PPIB, d'une taille de 639 paires de base, qui correspond à la séquence 11-650 sur la séquence PPIB de référence (Genbank M60857)

25 Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorces d'amplification utilisée pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage comprend une première amorce comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Ladite première amorce  
30 d'amplification est préférentiellement de SEQ ID N°30 et ladite deuxième amorce  
~~d'amplification comprend préférentiellement au moins 10, préférentiellement 15 et~~

---

encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°28.

Lors de l'étape C, on utilise au moins une sonde de détection pour détecter la présence desdits amplicons. Cette étape de détection, peut être réalisée par tous les protocoles connus de l'homme du métier concernant la détection d'acides nucléiques.

Au sens de la présente invention, on entend par sonde d'hybridation, une séquence nucléique de 10 à 100 motifs nucléotidiques, notamment de 15 à 35 motifs nucléotidiques, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées

pour former un complexe d'hybridation avec une séquence nucléique cible. La sonde d'hybridation peut comprendre un marqueur permettant sa détection. On parle alors de sondes de détection. Par détection on entend soit une détection directe par une méthode physique, soit une détection indirecte par une méthode de détection à l'aide d'un

marqueur. De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques. [Voir par exemple Kricka et al., Clinical Chemistry, 1999, n° 45(4), p.453-458 ou Keller G.H. et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6, p.173-249]. Par marqueur, on entend un traceur capable d'engendrer un signal que l'on

peut détecter. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou

luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la bêta-galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase; les chromophores comme les

composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à densité électronique détectables par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des

mesures d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les molécules radioactives comme  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^{125}\text{I}$ .

Au sens de la présente invention, la sonde d'hybridation peut être une sonde dite de détection. Dans ce cas, la sonde dite de détection est marquée au moyen d'un marqueur tel que défini précédemment. Grâce à la présence de ce marqueur, on peut détecter la



présence d'une réaction d'hybridation entre une sonde de détection donnée et la séquence cible spécifique d'une espèce donnée.

La sonde de détection peut être notamment une sonde de détection « molecular beacons » telle que décrite par Tyagi & Kramer (Nature biotech, 1996, 14 :303-308).

- 5 Ces "molecular beacons" deviennent fluorescentes lors de l'hybridation. Elles possèdent une structure de type tige-boucle et contiennent un fluorophore et un groupe "quencher". La fixation de la séquence de boucle spécifique avec sa séquence complémentaire d'acide nucléique cible provoque un déroulement de la tige et l'émission d'un signal fluorescent lors de l'excitation à la longueur d'onde qui convient.
- 10 La sonde d'hybridation peut être également une sonde dite de capture. Dans ce cas, la sonde dite de capture est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption. On détecte alors la réaction d'hybridation entre une sonde de capture donnée et une séquence cible.
- 15 Pour la détection de la réaction d'hybridation, on peut utiliser des séquences cibles marquées, directement (notamment par l'incorporation d'un marqueur au sein de la séquence cible) ou indirectement (notamment par l'utilisation d'une sonde de détection telle que définie précédemment) la séquence cible. On peut notamment réaliser avant l'étape d'hybridation une étape de marquage et/ou de clivage de la séquence cible, par
- 20 exemple en utilisant un désoxyribonucléotide triphosphate marqué lors de la réaction d'amplification enzymatique. Le clivage peut être réalisé notamment par l'action de l'imidazole et de chlorure de manganèse. La séquence cible peut aussi être marqué après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde de détection selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO 91/19812. Un autre
- 25 mode particulier préférentiel de marquage d'acides nucléiques est décrit dans la demande FR2 780 059.

Comme support solide, on peut utiliser des matériaux de synthèse ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, notamment les polysaccharides tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose

- 30 tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose ou le dextrane, des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles  
telles que le coton, et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux

minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande WO 94/12670, d'une particule.

5 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la sonde de détection comprend un fluorphore et un quencher. Selon un mode encore plus préféré de réalisation de l'invention, la sonde d'hybridation comprend un fluorphore FAM (6-carboxy-fluorescein) ou ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en son extrémité 5' et un quencher (Dabsyl) en son extrémité 3'. Dans la suite de l'exposé, une telle sonde d'hybridation  
10 est appelée « molecular beacon ».

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, les étapes B et C sont effectuées en même temps. Ce mode préféré peut être mise en oeuvre par « NASBA en temps réel » qui regroupe en une étape unique la technique d'amplification NASBA et la détection en temps réel qui fait appel à des "molecular beacons". La réaction NASBA intervient  
15 dans le tube, produisant de l'ARN simple brin avec lequel les "molecular beacons" spécifiques peuvent s'hybrider simultanément pour donner un signal fluorescent. La formation des nouvelles molécules d'ARN est mesurée en temps réel par contrôle continu du signal dans un lecteur fluorescent. Contrairement à une amplification par RT-PCR, l'amplification en NASBA peut se faire en présence d'ADN dans  
20 l'échantillon. Il n'est donc pas nécessaire de vérifier que l'ADN a bien été complètement éliminé lors de l'extraction des ARN.

Lorsqu'on utilise, lors de l'étape B, une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage, lesdits amplicons spécifiques d'un  
25 gène de ménage peuvent être détectés comparablement à ce qui est décrit précédemment, par notamment l'utilisation d'une sonde de détection. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le gène de ménage est le gène PPIB qui code la cyclophylène B et la sonde de détection comprend au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique  
30 choisie parmi SEQ ID N°27 à 29. Préférentiellement, cette sonde de détection comprend un fluorphore et un quencher.

L'invention concerne également une amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15, et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'amorce d'amplification comprend  
5 un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Cette amorce peut être notamment l'une quelconque des SEQ ID N° 21 à 24, et est préférentiellement utilisée dans une réaction d'amplification NASBA.

L'invention concerne également une paire d'amorce choisi parmi les paires d'amorces suivantes :

10     □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ  
15 ID N°2; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°1, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°2, on obtient un amplicon, spécifique du gène codant ESR1, d'une taille de 202 paires de base, qui correspond à la séquence 1427-1629 sur la séquence codant ESR1 de référence (Genbank X03635).

20     □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ  
25 ID N°4 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°3, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°4, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant PGR, d'une taille de 184 paires de base, qui correspond à la séquence 2761-2945 sur la séquence codant PGR de référence (Genbank NM\_000926).

30     □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques  
-----  
de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce

d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°5, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°6, on obtient alors un

5 amplicon, spécifique du gène codant ESR2, d'une taille de 210 paires de base, qui correspond à la séquence 1640-1850 sur la séquence codant ESR2 de référence (Genbank MN\_001437)

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques

10 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°7, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°8, on obtient alors un

15 amplicon, spécifique du gène codant HER2, d'une taille de 185 paires de base, qui correspond à la séquence 2567-2752 sur la séquence codant HER2 de référence (Genbank MN\_004448).

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques

20 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°13 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°14 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°13, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°14, on obtient un

25 amplicon, spécifique du gène codant ESR1, d'une taille de 858 paires de base, qui correspond à la séquence 808-1666 sur la séquence codant ESR1 de référence (Genbank X03635).

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques

30 de la séquence nucléotidique SEQ ID N°15 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ

ID N°16 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°15, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°16, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant PGR, d'une taille de 658 paires de base, qui correspond à la séquence 2319-2977 sur la séquence codant PGR de référence (Genbank NM\_000926).

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°17 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°18 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°17, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°18, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant ESR2, d'une taille de 702 paires de base, qui correspond à la séquence 1246-1948 sur la séquence codant ESR2 de référence (Genbank MN\_001437)

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°19 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°20 ; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°19, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°20, on obtient alors un amplicon, spécifique du gène codant HER2, d'une taille de 928 paires de base, qui correspond à la séquence 2123-3051 sur la séquence codant HER2 de référence (Genbank MN\_004448).

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, ladite première amorce comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Cette amorce peut être notamment l'une quelconque des SEQ ID 21 à 24. Lorsque première amorce comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7, cette première amorce est préférentiellement comprise dans une paire-d'amorces choisie parmi les paires d'amorce-

---

suivantes :

- une première amorce d'amplification de SEQ ID N°21 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2;
- 5 □ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°22 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ;
- 10 □ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°23 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ;
- 15 □ une première amorce d'amplification de SEQ ID N°24 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ;

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une amorce d'amplification telle que définie précédemment et/ou d'au moins une paire d'amorce telle que définie précédemment lors d'une réaction d'amplification NASBA.

- 20 L'invention concerne également une amorce d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage. Cette amorce d'amplification comprend préférentiellement au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence choisie parmi les SEQ ID N°25 à 29.

L'invention concerne également une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage, choisie parmi les paires suivantes :

- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°27 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°28; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°27, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°28, on obtient un

amplicon, spécifique du gène PPIB, d'une taille de 239 paires de base, qui correspond à la séquence 231-470 sur la séquence PPIB de référence (Genbank M60857)

- 5      □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°25 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°26; à titre indicatif, lorsque la première amorce a pour séquence la SEQ ID N°25, et la deuxième amorce a pour séquence la SEQ ID N°26, on obtient un  
10      amplicon, spécifique du gène PPIB, d'une taille de 639 paires de base, qui correspond à la séquence 11-650 sur la séquence PPIB de référence (Genbank M60857).

- 15      Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite paire d'amorces d'amplification utilisée pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage comprend une première amorce comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7. Ladite première amorce d'amplification est préférentiellement de SEQ ID N°30 et ladite deuxième amorce d'amplification comprend préférentiellement au moins 10, préférentiellement 15 et  
20      encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°28.

L'invention concerne également une sonde de détection comprenant au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20.

- 25      Préférentiellement, cette sonde de détection comprend un fluorphore et un quencher.

L'invention concerne également une sonde d'hybridation pour détecter des amplicons spécifiques d'un gène de ménage. Préférentiellement, cette sonde de détection comprend au moins 10, préférentiellement 15 et encore plus préférentiellement 20 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°27 à 29.

- 30      Préférentiellement, cette sonde de détection comprend un fluorphore et un quencher.

~~----- L'invention concerne également l'utilisation d'au moins une amorce telle que définie  
précédemment et/ou d'au moins une paire d'amorces telle que définie précédemment~~

et/ou d'au moins une sonde de détection telle que définie précédemment pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein.

L'invention concerne enfin un kit pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein comprenant au moins une amorce telle que définie précédemment et/ou d'au moins une  
 5 paire d'amorces telle que définie précédemment et/ou d'au moins une sonde de détection telle que définie précédemment.

La figure suivante est donnée à titre illustrative et n'a aucun caractère limitatif. Elle permettra de mieux comprendre l'invention.

10 La figure 1 représente les courbes standards obtenues pour les gènes ESR1 (fig 1a), PGR (fig 1b), ESR2 (fig 1c), HER2 (fig 1d), et PPIB (fig 1e) telles que décrites dans l'exemple 1-3a. Chaque courbe standard, obtenue pour chaque gène à partir d'une séquence de référence qui est spécifique du gène, transcrits en ARN in vitro dans un plasmide, représente le temps d'apparition de la phase exponentielle de l'amplification  
 15 (on parle également de TTP : time to positivity, temps seuil) en fonction du nombre de copies d'ARN présentes au début de l'amplification par NASBA (plus la quantité de départ de copies d'ARN est importante au début de l'amplification, plus le temps d'apparition de la phase exponentielle est court).

20 Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

### **Exemple 1 - Amplification et détection en temps réel des ARNm codant ESR1, PGR, ESR2 et HER2**

25

#### **1/ Obtention et préparation des échantillons**

Cet exemple a été réalisé à partir de trois lignées de cellules tumorales, dont l'expression en récepteurs hormonaux a préalablement été déterminée par IHC ou radioligand), ont été utilisées : MCF-7 (exprimant les récepteurs ESR1 et PGR), T47D  
 30 (n'exprimant pas le récepteur ESR1 et exprimant le récepteur PGR) et BT-549 (n'exprimant ni le récepteur ESR1, ni le récepteur PGR). Ces lignées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). Ces lignées cellulaires



ont été mises en culture dans un milieu DMEM (MCF-7) ou RPMI 1640 (T47D et BT-549), supplémenté en sérum fœtal de bœuf (10%), L glutamine (2mM), acides aminés non essentiels (1%) et streptomycine (10 µg/ml) à 37°C sous atmosphère comprenant 5% de CO<sub>2</sub>.

- 5 Cet exemple a également été réalisé à partir de tumeurs de patientes atteintes d'un cancer du sein dont l'expression en récepteurs hormonaux (ESR1 et PGR) est connue (préalablement déterminée par IHC).

## **2/ Extraction des ARN totaux**

- 10 Les ARN totaux ont été extraits de lignées cellulaires, par l'utilisation de Trizol® Reagent selon les recommandations des fournisseur du kit (Invitrogen, Canada). La qualité et la quantité en ARN ont été déterminées à 260 et 280 nm et contrôlées sur gel agarose. Les ARN ont ensuite été congelés à -70°C jusqu'à utilisation.
- Des ARN totaux ont également été extraits d'une façon comparable de tumeurs de
- 15 patientes atteintes d'un cancer du sein.

## **3) Amplification par NASBA**

- La réaction d'amplification par NASBA est basée sur l'activité simultanée d'une reverse transcriptase du virus aviaire myéloblaste (AMV-RT), d'une RNase H d'E. coli
- 20 et d'une ARN polymérase du bacteriophage T7 (Compton J, 1991, Nature, 350 : 91-92). La détection en temps réel des amplicons est réalisée par l'utilisation d'un lecteur Nuclisens EasyQ® (bioMérieux BV, The Netherland) et sondes de détection « molecular beacons », telles que définies précédemment. La quantification en NASBA est basée sur l'utilisation d'une courbe standard, obtenue à partir d'une séquence de
- 25 référence, spécifique du gène cible, transcrits en ARN in vitro dans un plasmide. Cette courbe standard représente le temps d'apparition de la phase exponentielle de l'amplification en fonction du nombre de copies d'ARN présentes au début de l'amplification par NASBA (plus la quantité de départ de copies d'ARN est importante au début de l'amplification, plus le temps d'apparition de la phase exponentielle est
- 30 court).

**a) Amplification des gènes ESR1, PGR, ESR2, HER2 et du gène de ménage PPIB -  
Obtention d'une courbe standard**

***Courbe standard du gène cible codant ESR1***

Pour le gène cible codant ESR1 (séquence de référence NCBI accession number :  
5 X03635), il a été utilisée une première amorce de SEQ ID N°13 5' TACAGGCCAA  
ATTCAGATAA TCGAC 3' et une deuxième amorce de SEQ ID N°14 5'  
GGAACCGAGAT GATGTAGCCA 3', localisées respectivement en position 808-832  
et 1646-1666 de la séquence de référence, afin de générer en PCR (un 1er cycle de  
dénaturation (95°C; 1 min); puis 35 cycles comprenant les étapes suivantes :  
10 dénaturation: 94°C; 1 min ; hybridation: 60°C; 1 min ; élongation: 72°C; 2 min) et un  
dernier cycle comprenant une étape de dénaturation: 72°C; 7 min) un amplicon de 858  
paires de bases, spécifique du gène codant ESR1 (on parlera d' « amplicon ESR1 »).

Les amplicons ESR1 obtenus tels que décrit ci dessus, ont ensuite été clonés en  
plasmide pGEM-T (Promega, Madison, USA).

15 La séquence de ces amplicons ESR1 a été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en  
Velin, France), afin de s'assurer qu'il correspondait bien à la séquence du gène cible  
que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène  
ESR1.

Les amplicons ont alors été transcrits en ARN in vitro par l'utilisation d'une ARN  
20 polymérase (T7 ou SP6 (Megascript® kit, Ambion, Austin, USA), selon l'orientation de  
l'amplicon). Après élimination du plasmide par traitement à la DNase, les ARN ont été  
purifiés par Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et quantifiés  
(RNA6000Nano, Agilent Technologies, Walbronn, Germany).

Les ARN obtenus ci dessus ont été dilués à différentes concentrations (solution stock :  
25  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l, dilution en cascade  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l à  $0,2 \cdot 10^2$  copies/ $\mu$ l). Ces  
dilutions en cascade sont amplifiées par NASBA à l'aide du kit Nuclisens basic®  
(bioMérieux BV, The Netherlands) en présence des amorces spécifiques ESR1 SEQ ID  
N° 1 et ESR1 N°2 et du « molecular beacons » SEQ ID N°9 :

□  $0,2 \mu$ M d'une première amorce ESR1 de SEQ ID N°1 5' CTCCACCATG  
30 CCCTCTACAC A 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule,  
une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une

première amorce dont la séquence entière est la SEQ ID N°21 : 5' aattctaata  
cgactcacta tagggagaag gCTCCACCAT GCCCTCTACA CA 3',

□ 0,2 µM d'une deuxième amorce ESR1 de SEQ ID N°2 5' ACATGATCAA  
CTGGGCGAAG A 3').

5 □ 0,1µM de «molecular beacons» comprenant la SEQ ID N°9 5'  
GATCCTGATGATTGGTCTCG 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-  
carboxy-fluorescein) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence  
complète : 5' FAM-cgatcgGATC CTGATGATTG GTCTCGcgat cg-Dabsyl 3'.

Au cours de l'amplification le signal s'intensifie proportionnellement à la quantité  
10 d'amplicons produits. La courbe de fluorescence en fonction du temps permet de définir  
le temps ou la phase exponentielle de l'amplification démarrera (encore appelé TTP :  
time to positivity, temps seuil). La courbe standard ESR1 relie le nombre de transcrit  
présent au départ dans la solution en fonction du TTP détecté lors de l'amplification  
NASBA. A l'aide d'une courbe standard, on calcule de manière absolue le nombre de  
15 copies du gène cible. Enfin cette valeur est normalisée grâce à un gène de ménage, en  
l'occurrence le gène PPIB. Cette courbe standard ESR1, représentée figure 1a.

#### *Courbe standard du gène cible codant PGR*

La courbe du gène cible codant PGR a été réalisée selon le même principe que pour  
ESR1, à l'exception des amorces d'amplification utilisées et des «molecular beacons »,  
20 qui étaient spécifiques de PGR.

Ainsi, pour le gène cible codant PGR (séquence de référence NCBI accession number :  
NM\_000926), il a été utilisée une première amorce de SEQ ID N°15 5'  
TGACAAGTCT TAATCAACTA GG 3'et une deuxième de SEQ ID N°16 5'  
TCACTTTTAT GAAAGAGAAG GG 3', localisées respectivement en position 2319-  
25 2340 et 2955-2977 de la séquence de référence. La séquence de ces amplicons PGR a  
été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer qu'il  
correspondait bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les  
amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène PGR.

Les amplicons ont alors été transcrits en ARN in vitro par l'utilisation d'une ARN  
30 polymerase (T7 ou SP6 (Megascript® kit, Ambion, Austin, USA), selon l'orientation de  
l'amplicon). Après élimination du plasmide par traitement à la DNase, les ARN ont été

---

purifiés par Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et quantifiés (RNA6000Nano, Agilent Technologies, Walbronn, Germany).

Les ARN obtenus ci dessus ont été dilués à différentes concentrations (solution stock : 0,2.10<sup>11</sup> copies/μl, dilution en cascade 0,2.10<sup>11</sup> copies/μl à 0,2.10<sup>2</sup> copies/μl). Ces dilutions en cascade sont amplifiées par NASBA à l'aide du kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands) en présence

- 0,1μM d'une première amorce PGR de SEQ ID N°3 5' TCCCTGCCAA TATCTTGGGT A 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule, une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°22 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gTCCCTGCCA ATATCTTGGG TA 3',
- 0,1 μM d'une deuxième amorce PGR de SEQ ID N°4 5' AGTTGTGTCG AGCTCACAGC 3',
- 0,1 μM de « molecular beacons » utilisées comprenant la SEQ ID N°10 5' CGGGCACTGAGTGTGAATT 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) à leur extrémité 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) à son extrémité 3' (séquence complète : 5' FAM-cgatcgCGGG CACTGAGTGT TGAATTcgat cg-Dabsyl 3').

La courbe standard PGR est représentée figure 1B.

#### *Courbe standard du gène cible codant ESR2*

La courbe du gène cible codant ESR2 a été réalisée selon le même principe que pour ESR1, à l'exception des amorces d'amplification utilisées et des « molecular beacons », qui étaient spécifiques de PGR

Ainsi, pour le gène cible codant ESR2 (séquence de référence NCBI accession number : MN\_001437), il a été utilisée une première amorce de SEQ ID N°17 5' GCCGCCCCAT GTGCTGAT 3' et une deuxième amorce de SEQ ID N°18 5' GGACCCCGTGA TGGAGGACTT 3', localisées respectivement en position 1246-1263 et 1928-1948 de la séquence de référence. La séquence de ces amplicons ESR2 a été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer qu'il correspondait bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène ESR2.

Les amplicons ont alors été transcrits en ARN in vitro par l'utilisation d'une ARN polymérase (T7 ou SP6 (Megascript® kit, Ambion, Austin, USA), selon l'orientation de l'amplicon). Après élimination du plasmide par traitement à la DNase, les ARN ont été purifiés par Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et quantifiés

(RNA6000Nano, Agilent Technologies, Walbronn, Germany). Les ARN obtenus ci dessus ont été dilués à différentes concentrations (solution stock :  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l, dilution en cascade  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l à  $0,2 \cdot 10^2$  copies/ $\mu$ l). Ces dilutions en cascade sont amplifiées par NASBA à l'aide du kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands) en présence de :

- 10     □ 0,2  $\mu$ M d'une première amorce ESR2 de SEQ ID N°5 5' TGAGCAGATG TTCCATGCCC T 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est la SEQ ID N°23 : 5' aattctaata cgactcata tagggagaag gTGAGCAGAT GTTCCATGCC CT 3',
- 15     □ 0,2  $\mu$ M d'une deuxième amorce ESR2 de SEQ ID N°6 5' TCCAGTATGT ACCCTCTGGT 3',
- 0,1  $\mu$ M de « molecular beacons » comprenant la SEQ ID N°11 5' GATGCTTTGGTTTGGGTGAT 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3'.
- 20     La courbe standard ESR2 est représentée figure 1C.

#### *Courbe standard du gène cible codant HER2*

La courbe du gène cible codant HER2 a été réalisée selon le même principe que pour ESR1, à l'exception des amorces d'amplification et des « molecular beacons », qui étaient spécifiques de HER2.

- 25     Ainsi, pour le gène cible codant HER2 (séquence de référence NCBI accession number : NM\_00448), il a été utilisée une première amorce de SEQ ID N°19 5' TGGTTGGCAT TCTGCTGGTC GTGGT 3' et une deuxième amorce de SEQ ID N°20 5' TGGCCGACAT TCAGAGTCAA TCATC 3', localisées respectivement en position 2123-2147 et 3027-3051 de la séquence de référence. La séquence de ces amplicons

- 30     HER2 a été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer

qu'il correspondait bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène HER2.

La séquence de ces amplicons HER2 a été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer qu'il correspondait bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus étaient bien spécifiques du gène HER2.

- 5 Les amplicons ont alors été transcrits en ARN in vitro par l'utilisation d'une ARN polymerase (T7 ou SP6 (Megascript® kit, Ambion, Austin, USA), selon l'orientation de l'amplicon). Après élimination du plasmide par traitement à la DNase, les ARN ont été purifiés par Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et quantifiés (RNA6000Nano, Agilent Technologies, Walbronn, Germany).
- 10 Les ARN obtenus ci dessus ont été dilués à différentes concentrations (solution stock :  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l, dilution en cascade  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l à  $0,2 \cdot 10^2$  copies/ $\mu$ l). Ces dilutions en cascade sont amplifiées par NASBA à l'aide du kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands) en présence de :
  - $0,2 \mu$ M d'une première amorce HER2 de SEQ ID N°7 5' GAGCCAGCCC
  - 15 GAAGTCTGTA 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°24 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag g GAGCCAGC CCGAAGTCTG TA 3',
  - $0,2 \mu$ M d'une deuxième amorce HER2 de SEQ ID N°8 5' TCTTAGACCA
  - 20 TGTCCGGGAA A 3',
  - $0,1 \mu$ M de « molecular beacons » utilisées comprenait la SEQ ID N°12 5' GGAGGATGTG CGGCTCGTAC 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) à leur extrémité 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) à son extrémité 3'.
  - 25 La courbe standard HER2 est représentée figure 1D.

#### *Courbe standard du gène cible PPIB*

La courbe du gène cible PPIB a été réalisée selon le même principe que pour ESR1, à l'exception des amorces d'amplification et des « molecular beacons », qui étaient spécifiques de PPIB.

- 30 Ainsi, pour le gène de ménage PPIB (séquence de référence NCBI accession number : M60857), il a été utilisée une première amorce de SEQ ID N°25 5' ACATGAAGGT GCTCCTTGCC 3' et une deuxième amorce de SEQ ID N°26 5' GTCCCTGTGC

CCTACTCCTT 3', localisées respectivement en position 11-30 et 631-650 de la séquence de référence. La séquence de ces amplicons PPIB a été vérifiée par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France), afin de s'assurer qu'il correspondait bien à la séquence du gène cible que l'on souhaitait amplifier. Les amplicons obtenus

5 étaient bien spécifiques du gène PPIB.

Les amplicons ont alors été transcrits en ARN in vitro par l'utilisation d'une ARN polymerase (T7 ou SP6 (Megascript® kit, Ambion, Austin, USA), selon l'orientation de l'amplicon). Après élimination du plasmide par traitement à la DNase, les ARN ont été purifiés par Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) et quantifiés

10 (RNA6000Nano, Agilent Technologies, Walbronn, Germany).

Les ARN obtenus ci dessus ont été dilués à différentes concentrations (solution stock :  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l, dilution en cascade  $0,2 \cdot 10^{11}$  copies/ $\mu$ l à  $0,2 \cdot 10^2$  copies/ $\mu$ l). Ces dilutions en cascade sont amplifiées par NASBA à l'aide du kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands) en présence de :

- 15     □ 0,2  $\mu$ M d'une première amorce PPIB de SEQ ID N°27 5' CAGGCTGTCT TGACTGTCGT GA 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°30 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCAGGCTGTC TTGACTGTCG TGA 3',
- 20     □ 0,2  $\mu$ M d'une deuxième amorce PPIB de SEQ ID N°28 5' AGGAGAGAAA GGATTTGGCT 3'
- 0,1  $\mu$ M de « molecular beacons » comprenant la SEQ ID N°29 5' GATCCAGGGCGGAGACTTCA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence
- 25       complète : 5' ROX-cgatcgGATC CAGGGCGGAG ACTTCacgat cg-Dabsyl 3'.

La courbe standard PPIB est représentée figure 1E.

#### b) réaction d'amplification par NASBA :

##### b1) Amplification en duplex des gènes ESR1 et PPIB

30 Cette réaction d'amplification a été réalisée à l'aide d'un kit Nuclisens basic® (bioMérieux-BV, The Netherlands). Pour cela, 5 ng d'ARN totaux, extraits des

---

différentes lignées cellulaires, ont été ajoutés à 10  $\mu$ l de tampon NASBA (concentration

finale dans 20 µl de milieu réactionnel : 40 mM de Tris HCl pH 8,5, 12mM MgCl<sub>2</sub>, 70mM KCl, 5mM dithiothreitol, 15% v/v DMSO, 1mM de chaque dNTP, 2mM de chaque NTP).

Dans ce milieu a été ajouté, 0,1µM de « molecular beacons » comprenant

- 5      □ la SEQ ID N°9 5' GATCCTGATGATTGGTCTCG 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' FAM-*cgatcg*GATC CTGATGATTG GTCTCG*cgat cg*-Dabsyl 3', pour la détection des ARN du gène ESR1
- 10      □ la SEQ ID N°29 5' GATCCAGGGCGGAGACTTCA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-*cgatcg*GATC CAGGGCGGAG ACTTC*Acgat cg*-Dabsyl 3', pour la détection des ARN du gène PPIB,

Dans ce milieu a également été ajouté :

- 15      □ 0,2µM d'une première amorce ESR1 de SEQ ID N°1 5' CTCCACCATG CCCTCTACAC A 3', comprenant, en son extrémité 5',et indiqué en minuscule, une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est la SEQ ID N°21 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCTCCACCAT GCCCTCTACA CA 3',
- 20      □ 0,2 µM d'une deuxième amorce ESR1 de SEQ ID N°2 5' ACATGATCAA CTGGGCGAAG A 3',
- 25      □ 0,2 µM d'une première amorce PPIB de SEQ ID N°27 5' CAGGCTGTCT TGACTGTCGT GA 3', comprenant, en son extrémité 5',et indiqué en minuscule, une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°30 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCAGGCTGTC TTGACTGTCG TGA 3',
- 30      □ 0,2 µM d'une deuxième amorce PPIB de SEQ ID N°28 5' AGGAGAGAAA GGATTTGGCT 3'.

Une préincubation a été réalisée durant 2 minutes à 65°C avant une incubation de 2 minutes à 41°C. Un volume de 5 µl d'un mélange d'enzyme (0,08U de RNase H, 32U d'ARN polymerase T7, 6,4 U d'AMV-RT) a été ajoutée, et une incubation de 90 minutes a été réalisée à 41°C.



La quantification des ARN transcrits a été déterminée en temps réel (NucliSens EasyQ, bioMérieux), la réaction NASBA produisant des amplicons avec lequel les "molecular beacons" spécifiques peuvent s'hybrider simultanément pour donner un signal fluorescent. La formation des nouvelles molécules d'ARN est mesurée en temps réel par

5 contrôle continu du signal dans un lecteur fluorescent, l'analyseur NucliSens EasyQ. L'analyse et la communication automatisée des données sont assurées par le logiciel Nuclisens TTP (bioMérieux BV, The Netherlands). La courbe standard, telle que définie précédemment (dilution ARN transcrits :  $10^8$  à  $10^2$  copies) a été utilisée pour la

10 quantification de l'expression de chacun du gène cible ESR1 et du gène de ménage PPIB, afin d'extrapoler le nombre de copies d'ARNm par échantillon. La quantification de l'expression d'un gène cible a été exprimé par nombre de copies d'ARNm/ 5ng d'ARN totaux.

Le tableau 1 présente l'expression du gène ESR1 quantifiée à partir de 5 ng d'ARN totaux provenant des lignées cellulaires MCF-7, T47D et BT-549.

15

	Nbre copies ARNm ESR1	Nbre copies ARNm PPIB	ESR1/PPIB
MCF-7	$2,24 \times 10^4$	$7,43 \times 10^3$	$3,01 \times 10^{-2}$
T47D	$3,24 \times 10^4$	$2,34 \times 10^6$	$1,38 \times 10^{-2}$
BT549	NC	$4.43 \times 10^6$	NC

Tableau 1 - Expression du gène ESR1 dans les cellules MCF-7, T47D, BT-549 (NC : non calculable)

L'expression du gène ESR1 a été exprimée par le ratio entre le nombre de copies d'ARNm du gène cible et le nombre de copies d'ARNm du gène de ménage. Ainsi, des

20 ARNm de ESR1 étaient exprimés dans les cellules MCF-7 alors qu'ils n'étaient pas détectées dans les cellules BT-549, en accord avec l'expression en récepteurs hormonaux de ces cellules. A noter que des ARNm de ESR1 étaient exprimés dans les cellules T47D, alors que seul le récepteur PGR était exprimé, suggérant une régulation post transcriptionnelle du gène ESR1.

25

Le tableau 3 présente l'expression du gène ESR1 quantifiée à partir de 50 ng d'ARN totaux provenant de tumeurs IHC +, c'est à dire exprimant des récepteurs hormonaux nucléaires des cellules tumorales, ou de tumeurs IHC-, c'est à dire n'exprimant pas de récepteurs hormonaux nucléaires (moyenne sur 3-7 tumeurs).

	Moyenne copies ARNm ESR1	Moyenne copies ARNm PPIB	ESR1/PPIB
Tumeurs IHC +	$2.64 \times 10^5$	$4.71 \times 10^6$	$5.61 \times 10^{-2}$
Tumeurs IHC -	$9.62 \times 10^3$	$9.39 \times 10^6$	$1.02 \times 10^{-3}$

Tableau 2 - Expression du gène ESR1 dans les tumeurs IHC + et IHC -

L'expression du gène ESR1 a été exprimée par le ratio entre le nombre de copies d'ARNm du gène cible et le nombre de copies d'ARNm du gène de ménage. Une surexpression du gène ESR1 était observée dans les tumeurs IHC +.

A partir des courbes standards ESR1 et PPIB réalisées précédemment, la limite de détection et la limite de quantification ont été déterminées pour les gènes ESR1 et PPIB amplifiés en duplex. La limite de quantification était observée à 100 copies d'ARNm pour ESR1 et PPIB. La limite de détection était de 100 copies d'ARNm pour ESR1 et PPIB.

La spécificité du duplex ESR1/PPIB a été testée en réalisant l'amplification de ESR1 en présence de « molecular beacon » spécifique de PGR, et en réalisant l'amplification de PGR en présence de « molecular beacon » spécifique de ESR1. Aucun signal n'était détecté. De même, aucun signal n'était observé lorsque la NASBA était réalisé à partir d'ARN totaux issus de la lignée cellulaire BT-549, ESR1 et PGR négative.

Tous ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'une autre technique d'amplification (RT-PCR quantitative).

*Ces résultats démontrent que le duplex ESR1/PPIB en NASBA permet une quantification de l'expression du gène ESR1 à partir d'une très faible quantité d'ARN totaux, et, d'une façon plus large, à partir d'une très faible quantité de cellules tumorales, et est parfaitement adapté pour étudier le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein, et la réponse d'un patient à un traitement donné.*

## b2) Amplification en duplex des gènes PGR et PPIB

Cette réaction d'amplification a été réalisée à l'aide d'un kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands). Pour cela, 5 ng d'ARN totaux, extraits des

différentes lignées cellulaires, ont été ajouté à 10 µl de tampon NASBA (concentration finale dans 20 µl de milieu réactionnel : 40 mM de Tris HCl pH 8,5, 12mM MgCl<sub>2</sub>, 70mM KCl, 5mM dithiotreitol, 15% v/v DMSO, 1mM de chaque dNTP, 2mM de chaque NTP).

5 Dans ce milieu a été ajouté, 0,1µM de « molecular beacons » comprenant

- la SEQ ID N°10 5' CGGGCACTGAGTGTGAATT 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) à leur extrémité 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) à son extrémité 3' (séquence complète : 5' FAM-*cgatcg*CGGG CACTGAGTG T TGAATT*cg at cg*-Dabsyl 3') pour la détection des ARN codant PGR lors du duplex PGR / cyclophyline B,

10

- la SEQ ID N°29 5' GATCCAGGGCGGAGACTTCA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-*cgatcg*GATC CAGGGCGGAG ACTTCA*cgat cg*-Dabsyl 3', pour la détection des ARN du gène PPIB,

15 Dans ce milieu a également été ajouté :

- 0,1µM d'une première amorce PGR de SEQ ID N°3 5' TCCCTGCCAA TATCTTGGGT A 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule, une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°22 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gTCCCTGCCA ATATCTTGGG TA 3',

20

- 0,1 µM d'une deuxième amorce PGR de SEQ ID N°4 5' AGTTGTGTCTG AGCTCACAGC 3',

- 0,2 µM d'une première amorce PPIB de SEQ ID N°27 5' CAGGCTGTCT TGACTGTCTG GA 3', comprenant, en son extrémité 5',et indiqué en minuscule une séquence comprenant le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°30 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCAGGCTGTC TTGACTGTCTG TGA 3',

25

- 0,2 µM d'une deuxième amorce PPIB de SEQ ID N°28 5' AGGAGAGAAA GGATTTGGCT 3'.

30 Une préincubation a été réalisée durant 2 minutes à 65°C avant une incubation de 2 minutes à 41°C. Un volume de 5 µl d'un mélange d'enzyme (0,08U de RNase H, 32U

d'ARN polymerase T7, 6,4 U d'AMV-RT) a été ajoutée, et une incubation de 90 minutes a été réalisée à 41°C.

La quantification des ARN transcrits a été déterminée en temps réel selon un principe comparable à ce qui a été décrit pour ESR1. La courbe standard, telle que définie précédemment (dilution ARN transcrits :  $10^8$  à  $10^2$  copies) a été utilisée pour la quantification de l'expression du gène cible PGR et du gène de ménage PPIB, afin d'extrapoler le nombre de copies d'ARNm par échantillon. La quantification de l'expression d'un gène cible a été exprimé par nombre de copies d'ARNm/ 5ng d'ARN totaux.

Le tableau 3 présente l'expression du gène PGR quantifiée à partir de 5 ng d'ARN totaux provenant des lignées cellulaires MCF-7, T47D et BT-549.

	Nbre copies ARNm PGR	Nbre copies ARNm PPIB	PGR/PPIB
MCF-7	$4,35 \times 10^2$	$2,54 \times 10^6$	$1,71 \times 10^{-4}$
T47D	$3,92 \times 10^4$	$8,32 \times 10^5$	$4,71 \times 10^{-2}$
BT549	NC	$9,73 \times 10^6$	NC

Tableau 3 - Expression du gène PGR dans les cellules MCF-7, T47D, BT-549

L'expression du gène PGR a été exprimée par le ratio entre le nombre de copies d'ARNm du gène cible et le nombre de copies d'ARNm du gène de ménage. Ainsi, des ARNm de PGR étaient exprimés dans les cellules MCF-7 et T47D alors qu'ils n'étaient pas détectés dans les cellules BT-549, en accord avec l'expression en récepteurs hormonaux de ces cellules.

Le tableau 4 présente l'expression du gène PGR quantifiée à partir de 50 ng d'ARN totaux provenant de tumeurs IHC +, c'est à dire exprimant des récepteurs hormonaux à la surface des cellules tumorales, ou de tumeurs IHC-, c'est à dire n'exprimant pas de récepteurs hormonaux à leur surface (moyenne sur 3-7 tumeurs).

	Moyenne copies ARNm PGR	Moyenne copies ARNm PPIB	PGR/PPIB
Tumeurs IHC +	$2,78 \times 10^3$	$9,23 \times 10^7$	$3,01 \times 10^{-4}$
Tumeurs IHC -	$2,98 \times 10^3$	$1,91 \times 10^6$	$1,56 \times 10^{-4}$

Tableau 4 - Expression du gène PGR dans les tumeurs IHC + et IHC -

L'expression du gène PGR a été exprimée par le ratio entre le nombre de copies d'ARNm du gène cible et le nombre de copies d'ARNm du gène de ménage. Une surexpression du gène PGR était observée dans les tumeurs IHC +.

A partir des courbes standards PGR et PPIB réalisées précédemment, la limite de détection et la limite de quantification ont été déterminées pour les gènes PGR et PPIB amplifiés en duplex. La limite de quantification a été déterminée à 100 et 1000 copies d'ARNm pour PGR et PPIB respectivement. La limite de détection était de 100 copies d'ARNm pour PGR et PPIB.

La spécificité du duplex PGR/PPIB a été testée en réalisant l'amplification de PGR en présence de « molecular beacon » spécifique de ESR1. Aucun signal n'était détecté. De même, aucun signal n'était observé lorsque la NASBA était réalisé à partir d'ARN totaux issus de la lignée cellulaire BT-549, PGR négative.

Tous ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'une autre technique d'amplification (RT-PCR quantitative).

*Ces résultats démontrent que le duplex PGR/PPIB en NASBA permet une quantification de l'expression du gène PGR à partir d'une très faible quantité d'ARN totaux, et, d'une façon plus large, à partir d'une très faible quantité de cellules tumorales, et est parfaitement adapté pour étudier le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein, et la réponse d'un patient à un traitement donné.*

#### b3) Amplification en duplex des gènes ESR2 et PPIB

Cette réaction d'amplification a été réalisée à l'aide d'un kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands). Pour cela, 5 ng d'ARN totaux, extraits des différentes lignées cellulaires, ont été ajoutés à 10 µl de tampon NASBA (concentration finale dans 20 µl de milieu réactionnel : 40 mM de Tris HCl pH 8,5, 12mM MgCl<sub>2</sub>, 70mM KCl, 5mM dithiotreitol, 15% v/v DMSO, 1mM de chaque dNTP, 2mM de chaque NTP).

Dans ce milieu a été ajouté, 0,1µM de « molecular beacons » comprenant

- la SEQ ID N°11 5' GATGCTTTGGTTTGGGTGAT 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3',
- 5 □ la SEQ ID N°29 5' GATCCAGGGCGGAGACTTCA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-*cgatcg*GATC CAGGGCGGAG ACTTC*Acgat cg*-Dabsyl 3', pour la détection des ARN du gène PPIB codant la cyclophyline B,
- 10 Dans ce milieu a également été ajouté :
  - 0,2µM d'une première amorce ESR2 de SEQ ID N°5 5' TGAGCAGATG TTCCATGCCC T 3', comprenant, en son extrémité 5',et indiqué en minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est la SEQ ID N°23 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag
  - 15 gTGAGCAGAT GTTCCATGCC CT 3',
  - 0,2 µM d'une deuxième amorce ESR2 de SEQ ID N°6 5' TCCAGTATGT ACCCTCTGGT 3',
  - 0,2 µM d'une première amorce PPIB de SEQ ID N°27 5' CAGGCTGTCT TGACTGTCGT GA 3', comprenant, en son extrémité 5',et indiqué en
  - 20 minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°30 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCAGGCTGTC TTGACTGTCG TGA 3', 0,2 µM d'une deuxième amorce PPIB de SEQ ID N°28 5' AGGAGAGAAA GGATTTGGCT 3'.

Une préincubation a été réalisée durant 2 minutes à 65°C avant une incubation de 2  
 25 minutes à 41°C. Un volume de 5 µl d'un mélange d'enzyme (0,08U de RNase H, 32U d'ARN polymerase T7, 6,4 U d'AMV-RT) a été ajoutée, et une incubation de 90 minutes a été réalisée à 41°C.

La quantification des ARN transcrits a été déterminée en temps réel (NucliSens EasyQ, bioMérieux), la réaction NASBA produisant des amplicons avec lequel les "molecular  
 30 beacons" spécifiques peuvent s'hybrider simultanément pour donner un signal fluorescent. La formation des nouvelles molécules d'ARN est mesurée en temps réel par contrôle continu du signal dans un lecteur fluorescent, l'analyseur NucliSens EasyQ.

L'analyse et la communication automatisée des données sont assurées par le logiciel Nuclisens TTP (bioMérieux BV, The Netherlands). La courbe standard, telle que définie précédemment (dilution ARN transcrits :  $10^8$  à  $10^2$  copies) a été utilisée pour quantifier l'expression de chacun du gène cible ESR2 et du gène de ménage PPIB, ce qui a permis d'extrapoler le nombre de copies d'ARNm par échantillon.

A partir des courbes standards ESR2 et PPIB réalisées précédemment, la limite de détection et la limite de quantification ont été déterminées pour chacun des gènes. La limite de quantification était observée à 1000 et 10000 copies d'ARNm pour ESR2 et PPIB. La limite de détection était de 1000 copies d'ARNm pour ESR2 et PPIB.

La spécificité du duplex ESR2/PPIB a été testée en réalisant l'amplification de ESR2 en présence de « molecular beacon » spécifique de HER2, et en réalisant l'amplification de HER2 en présence de « molecular beacon » spécifique de ESR2. Aucun signal n'était détecté.

*Ces résultats démontrent que le duplex ESR2/PPIB en NASBA permet une amplification spécifique et sensible du gène ESR2 à partir d'une très faible quantité d'ARN totaux, rendant ce duplex parfaitement adapté pour étudier le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein, et la réponse d'un patient à un traitement donné.*

## b2) Amplification en duplex des gènes HER2 et PPIB

Cette réaction d'amplification a été réalisée à l'aide d'un kit Nuclisens basic® (bioMérieux BV, The Netherlands). Pour cela, 5 ng d'ARN totaux, extraits des différentes lignées cellulaires, ont été ajoutés à 10 µl de tampon NASBA (concentration finale dans 20 µl de milieu réactionnel : 40 mM de Tris HCl pH 8,5, 12mM MgCl<sub>2</sub>, 70mM KCl, 5mM dithiothreitol, 15% v/v DMSO, 1mM de chaque dNTP, 2mM de chaque NTP).

Dans ce milieu a été ajouté, 0,1 µM de « molecular beacons » comprenant

- la SEQ ID N°12 5' GGAGGATGTG CGGCTCGTAC 3', marquées avec un fluorophore FAM (6-carboxy-fluorescein) à leur extrémité 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) à son extrémité 3' pour la détection des ARN codant

HER2 lors du duplex HER2-/PPIB;

- la SEQ ID N°29 5' GATCCAGGGC GGAGACTTCA 3', marquées avec un fluorophore ROX (6-carboxy-X-rhodamine) en 5', et d'un « quencher » (Dabsyl) en 3' (séquence complète : 5' ROX-*cgatcg*GATC CAGGGCGGAG ACTTCA*cgat cg*-Dabsyl 3', pour la détection des ARN du gène PPIB codant la cyclophyline B,

Dans ce milieu a également été ajouté :

- 0,2 µM d'une première amorce HER2 de SEQ ID N°7 5' GAGCCAGCCC GAAGTCTGTA 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°24 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag g GAGCCAGC CCGAAGTCTG TA 3',
- 0,2 µM d'une deuxième amorce HER2 de SEQ ID N°8 5' TCTTAGACCA TGTCGGGAA A 3',
- 0,2 µM d'une première amorce cyclophyline B de SEQ ID N°27 5' CAGGCTGTCT TGACTGTCGT GA 3', comprenant, en son extrémité 5', et indiqué en minuscule le promoteur de la polymérase T7, c'est à dire une première amorce dont la séquence entière est SEQ ID N°30 : 5' aattctaata cgactcacta tagggagaag gCAGGCTGTC TTGACTGTCG TGA 3', 0,2 µM d'une deuxième amorce cyclophyline B de SEQ ID N°28 5' AGGAGAGAAA GGATTTGGCT 3'.

Une préincubation a été réalisée durant 2 minutes à 65°C avant une incubation de 2 minutes à 41°C. Un volume de 5 µl d'un mélange d'enzyme (0,08U de RNase H, 32U d'ARN polymérase T7, 6,4 U d'AMV-RT) a été ajoutée, et une incubation de 90 minutes a été réalisée à 41°C.

La quantification des ARN transcrits a été déterminée en temps réel (NucliSens EasyQ, bioMérieux), la réaction NASBA produisant des amplicons avec lequel les "molecular beacons" spécifiques peuvent s'hybrider simultanément pour donner un signal fluorescent. La formation des nouvelles molécules d'ARN est mesurée en temps réel par contrôle continu du signal dans un lecteur fluorescent, l'analyseur NucliSens EasyQ. L'analyse et la communication automatisée des données sont assurées par le logiciel Nuclisens TTP (bioMérieux BV, The Netherlands). La courbe standard, telle que définie précédemment (dilution ARN transcrits :  $10^8$  à  $10^2$  copies) a été utilisée pour quantifier



l'expression de chacun du gène cible HER2 et du gène de ménage PPIB, ce qui a permis d'extrapoler le nombre de copies d'ARNm par échantillon.

5 A partir des courbes standards HER2 et PPIB réalisées précédemment, la limite de détection et la limite de quantification ont été déterminées pour chacun des gènes. La limite de quantification a été déterminée à 1000 et 10000 copies d'ARNm pour HER2 et PPIB respectivement. La limite de détection était de 100 copies d'ARNm pour HER2 et PPIB.

10 La spécificité du duplex HER2/PPIB a été testée en réalisant l'amplification de ESR2 en présence de « molecular beacon » spécifique de HER2, et en réalisant l'amplification de HER2 en présence de « molecular beacon » spécifique de ESR2. Aucun signal n'était détecté.

15 *Ces résultats démontrent que le duplex HER2/PPIB en NASBA permet une amplification spécifique et sensible du gène HER2 à partir d'une très faible quantité d'ARN totaux, rendant ce duplex parfaitement adapté pour étudier le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein, et la réponse d'un patient à un traitement donné.*

---

## REVENDICATIONS

1. Procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein comprenant les étapes suivantes :

- 5           A - on extrait le matériel nucléique d'un échantillon biologique,  
           B - on utilise au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons d'au moins une séquence cible du matériel nucléique  
           C - on utilise au moins une sonde de détection pour détecter la présence desdits amplicons
- 10           caractérisé en ce que, lors de l'étape B, ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 et/ou lors de l'étape C), ladite sonde de détection comprend au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID
- 15           N°1 à SEQ ID N°20.

2. Procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein selon la revendication 1 caractérisé en ce que, lors de l'étape B, ladite paire d'amorces est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :

- 20           □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ;
- 25           □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ;
- 30           □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ;

- une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ;
  - 5 □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°13 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°14 ;
  - 10 □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°15 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°16 ;
  - 15 □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°17 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°18 ;
  - 20 □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°19 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°20.
3. Procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein selon l'une quelconque des revendication 1 ou 2 dans lequel ladite paire d'amorce comprend au moins une amorce d'amplification comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.

25
  4. Procédé pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans lequel, lors de l'étape C, la sonde de détection comprend un fluorphore et un quencher.

---

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans lequel la séquence cible est comprise dans un gène choisi parmi ESR1, ESR2, PGR, HER2.

---

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lequel les étapes B et C sont effectuées en même temps.
- 5 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'on on utilise, en outre, lors de l'étape B, au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage.
- 10 8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce l'amorce d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage comprend au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence choisie parmi les SEQ ID N°25 à 29.
- 15 9. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que ladite paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :
  - une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°27 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°28
  - 20 □ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°25 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°26
- 25 10. Amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 ; 25 à 29.
- 30 11. Amorce d'amplification selon la revendications 7 comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.
12. Paire d'amorce d'amplification choisie parmi les paires d'amorces suivantes :

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans lequel les étapes B et C sont effectuées en même temps.
- 5 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'on utilise, en outre, lors de l'étape B, au moins une paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage.
- 10 8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'amorce d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage comprend au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence choisie parmi les SEQ ID N°25 à 29.
- 15 9. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que ladite paire d'amorces d'amplification pour obtenir des amplicons spécifiques d'un gène de ménage est choisie parmi les paires d'amorce suivantes :
- 20 ☐ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°27 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°28
- ☐ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°25 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°26
- 25 10. Amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20 ; 25 à 29.
- 30 11. Amorce d'amplification selon la revendication 10 comprenant un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.
- 
12. Paire d'amorce d'amplification choisie parmi les paires d'amorces suivantes :

- 5

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ;
- 10

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°3 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°4 ;

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°5 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°6 ;
- 15

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°7 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°8 ;
- 20

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°13 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°14 ;

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°15 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°16 ;
- 25

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°17 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°18 ;
- 30

□ une première amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°19 et une deuxième amorce d'amplification comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques de la séquence nucléotidique SEQ ID N°20

13. Paire d'amorce selon la revendication 9 dans laquelle ladite première amorce comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.

5

14. Utilisation d'au moins une amorce d'amplification selon la revendication 7 ou 8 et/ou d'une paire d'amorce selon la revendication 9 ou 10 lors d'une réaction d'amplification NASBA

10

15. Sonde de détection comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20.

16. Sonde de détection selon la revendication 12 comprenant un flurophore et un quencher.

15

17. Utilisation d'au moins une amorce selon la revendication 7 ou 8 et/ou d'au moins une paire d'amorces selon la revendication 9 ou 10 et/ou d'au moins une sonde de détection selon la revendication 12 ou 13 pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein.

20

18. Kit pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein comprenant au moins une amorce selon la revendication 7 ou 8 et/ou d'au moins une paire d'amorces selon la revendication 9 ou 10 et/ou d'au moins une sonde de détection selon la revendication 12 ou 13.

25

13. Paire d'amorce selon la revendication 12 dans laquelle ladite première amorce comprend un promoteur permettant l'initiation de la transcription par une polymérase du bactériophage T7.

5

14. Utilisation d'au moins une amorce d'amplification selon la revendication 10 ou 11 et/ou d'une paire d'amorce selon la revendication 12 ou 13 lors d'une réaction d'amplification NASBA

10

15. Sonde de détection comprenant au moins 10 motifs nucléotidiques d'une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°20.

16. Sonde de détection selon la revendication 15 comprenant un flurophore et un quencher.

15

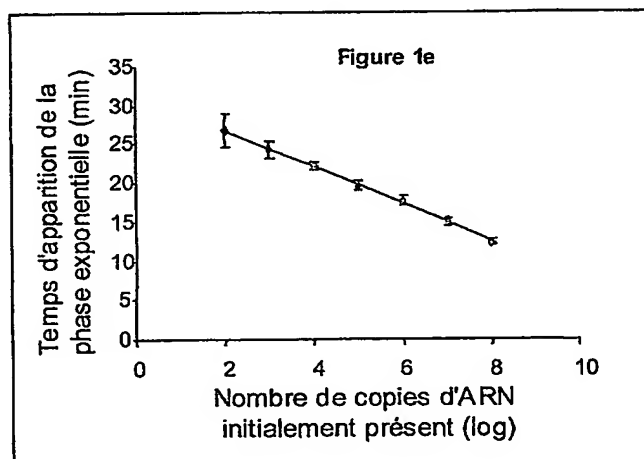
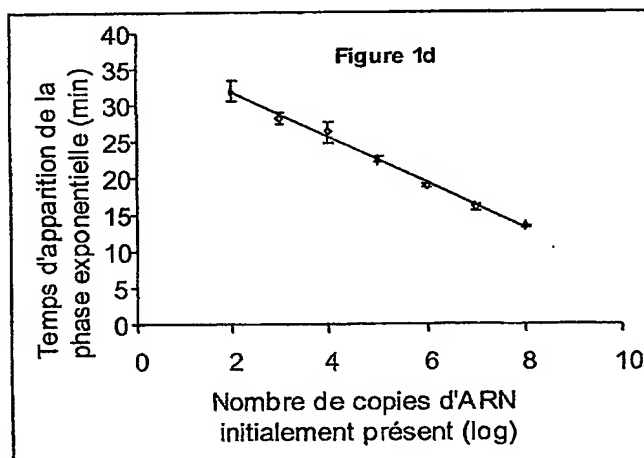
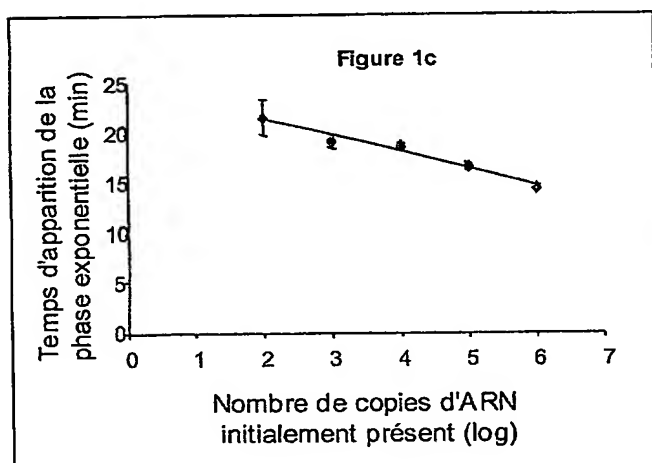
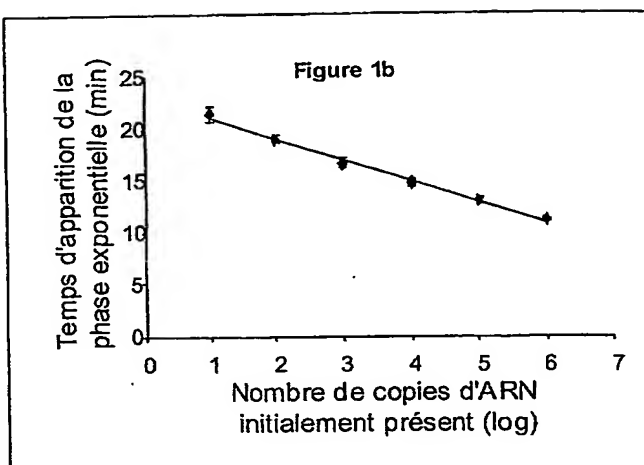
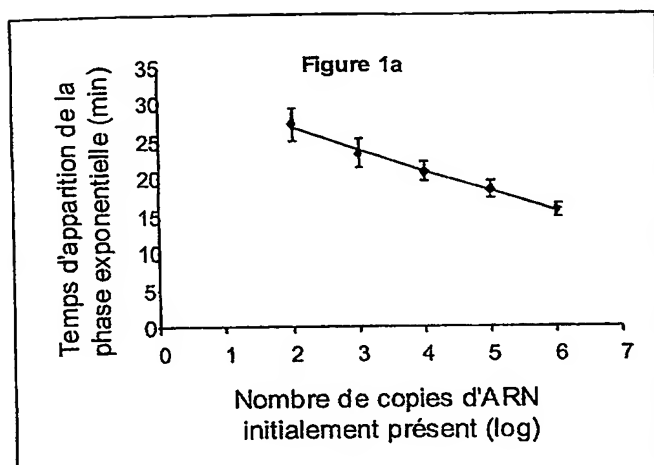
17. Utilisation d'au moins une amorce selon la revendication 10 ou 11 et/ou d'au moins une paire d'amorces selon la revendication 12 ou 13 et/ou d'au moins une sonde de détection selon la revendication 15 ou 16 pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein.

20

18. Kit pour le diagnostic/pronostic d'un cancer du sein comprenant au moins une amorce selon la revendication 10 ou 11 et/ou d'au moins une paire d'amorces selon la revendication 12 ou 13 et/ou d'au moins une sonde de détection selon la revendication 15 ou 16.

25





## SEQUENCE LISTING

5 <110> bioMérieux SA

10 <120> Procédé de diagnostic et/ou de pronostic du cancer du sein

<130> Unknown

15 <160> 30

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 21

<212> DNA

30 <213> Homo sapiens

35 <400> 1  
ctccaccatg ccctctacac a  
21

40 <210> 2

<211> 21

<212> DNA

45 <213> Homo sapiens

50 <400> 2  
acatgatcaa ctgggcgaag a  
21

55 <210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5

<400> 3

tccctgccaa tatcttgggt a  
21

10

<210> 4

<211> 20

15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 4

agttgtgtcg agctcacagc  
20

25

<210> 5

<211> 21

30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

35

<400> 5

tgagcagatg ttccatgccc t  
21

40

<210> 6

<211> 20

45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

50

<400> 6

tccagtatgt accctctggt  
20

55

---

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

10 gagccagccc gaagtctgta  
20

<210> 8

15

<211> 21

<212> DNA

20

<213> Homo sapiens

<400> 8

25 tcttagacca tgtccgggaa a  
21

<210> 9

30

<211> 20

<212> DNA

35

<213> Homo sapiens

<400> 9

40 gatcctgatg attggtctcg  
20

<210> 10

45

<211> 20

<212> DNA

50

<213> Homo sapiens

<400> 10

55 cgggcactga gtgttgaatt  
20

<210> 11

<211> 20

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 11  
gatgcttttg tttgggtgat  
20

15

<210> 12

<211> 20

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

25

<400> 12  
ggaggatgtg cggctcgtac  
20

30

<210> 13

<211> 25

35 <212> DNA

<213> Homo sapiens

40

<400> 13  
tacaggccaa attcagataa tcgac  
25

45

<210> 14

<211> 21

50 <212> DNA

<213> Homo sapiens

55

<400> 14  
ggaaccgaga tgatgtagcc a  
21

<210> 15  
5 <211> 22  
<212> DNA  
10 <213> Homo sapiens  
  
<400> 15  
15 tgacaagtct taatcaacta gg  
22  
  
<210> 16  
20 <211> 23  
<212> DNA  
25 <213> Homo sapiens  
  
<400> 16  
30 tcacttttta tgaaagagaa ggg  
23  
  
<210> 17  
35 <211> 18  
<212> DNA  
40 <213> Homo sapiens  
  
<400> 17  
45 gccgccccat gtgctgat  
18  
  
<210> 18  
50 <211> 21  
<212> DNA  
55 <213> Homo sapiens  
  
<400> 18

ggacccccgtg atggaggact t  
21

5 <210> 19

<211> 25

<212> DNA

10

<213> Homo sapiens

15 <400> 19

tggttggcat tctgctggtc gtggt  
25

20 <210> 20

<211> 25

<212> DNA

25

<213> Homo sapiens

30 <400> 20

tggccgacat tcagagtcaa tcatc  
25

35 <210> 21

<211> 52

<212> DNA

40

<213> Homo sapiens

45 <400> 21

aattctaata cgactcacta tagggagaag gctccaccat gccctctaca ca  
52

50 <210> 22

<211> 52

<212> DNA

55

<213> Homo sapiens

---

<400> 22  
5 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtccctgcc atatcttggg ta  
52

<210> 23  
10 <211> 52  
<212> DNA  
15 <213> Homo sapiens

<400> 23  
20 aattctaata cgactcacta tagggagaag gtgagcagat gttccatgcc ct  
52

<210> 24  
25 <211> 51  
<212> DNA  
30 <213> Homo sapiens

<400> 24  
35 aattctaata cgactcacta tagggagaag ggagccagcc cgaagtctgt a  
51

<210> 25  
40 <211> 20  
<212> DNA  
45 <213> Homo sapiens

<400> 25  
50 acatgaaggt gtccttgcc  
20

<210> 26  
55 <211> 20  
<212> DNA



<213> Homo sapiens

5 <400> 26  
gtccctgtgc cctactcctt  
20

10 <210> 27

<211> 22

<212> DNA

15 <213> Homo sapiens

20 <400> 27  
caggctgtct tgactgtcgt ga  
22

25 <210> 28

<211> 20

<212> DNA

30 <213> Homo sapiens

35 <400> 28  
aggagagaaa ggatttggct  
20

40 <210> 29

<211> 20

<212> DNA

45 <213> Homo sapiens

50 <400> 29  
gatccagggc ggagacttca  
20

55 <210> 30

---

<211> 53

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5

<400> 30

aattctaata cgactcacta tagggagaag gcaggctgtc ttgactgtcg tga

53

10



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

**N° Indigo 0 825 83 85 87**  
0,15 € TTC/min

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**cerfa**  
N° 11235\*03

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1.. / 1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

03 113 @ W / 210103

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		BREASTAM
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		03-14364
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Procédé pour le diagnostic/pronostic du cancer du sein		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> bioMérieux		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b> Nom		VERJAT
Prénoms		Thibaut
Adresse	Rue	68 rue Saint Jean
	Code postal et ville	69101 LYON - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b> Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
Marcy l'Etoile, le 8 décembre 2003 Frédérique DENJEAN Ingénieur Brevets		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**